

版本号: DP140916

RNAsimple Total RNA Kit

总RNA提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP419

产品内容

产品组成	DP419 (50 preps)
裂解液RZ (Buffer RZ)	60 ml
去蛋白液RD (Buffer RD)	12 ml
漂洗液RW (Buffer RW)	12 ml
RNase-Free ddH ₂ O	15 ml
RNase-Free吸附柱CR3 (含2 ml收集管) (RNase-Free Spin Column CR3 in a 2 ml Collection Tube)	50套
RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5 ml)	50个

储存条件

裂解液RZ 应在2-8℃ 避光保存, 其他溶液和吸附柱室温(15-25℃)保存。

产品简介

RNAsimple Total RNA Kit总RNA提取试剂盒是经过改进开发的新一代产品，提高了裂解液的裂解能力和提取的灵敏度，同时对硅基质膜的改进增强了对RNA的吸附能力，得到的RNA纯度更好，质量更高。该试剂盒可从各种细胞或组织中快速提取总RNA，每个吸附柱每次可处理50-100 mg组织或 5×10^8 细胞，可同时处理大量不同样品。一个小时内即可完成反应，提取的总RNA没有DNA和蛋白的污染，可用于Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆。

注意事项

若提取细菌RNA，推荐应用RNAprep Pure培养细胞/细菌总RNA提取试剂盒（目录号：DP430）

预防RNase污染，应注意以下几方面

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
 2. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 3. RNA在RZ中时不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150°C烘烤4 h，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
 4. 配制溶液应使用无RNase的水。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(V/V)，放置过夜，高压灭菌。）
-

操作步骤

第一次使用前应在去蛋白液RD、漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。

1. 样品处理

- a. 组织：将组织在液氮中磨碎。每50-100 mg组织加1 ml 裂解液RZ，用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积不应超过裂解液RZ体积的十分之一。
- b. 单层培养细胞：直接在培养板中加入裂解液RZ裂解细胞，每10 cm²面积加1 ml RZ。用取样器抽打若干次至溶液透明。

注意：裂解液RZ的加入量根据培养瓶面积决定，不是由细胞数决定。如果加量不足，可能导致提取的RNA中有DNA污染。

- c. 细胞悬液：离心取细胞，弃上清。每5-10 × 10⁶动物细胞和植物细胞加入1 ml 裂解液RZ。加裂解液RZ前不要洗涤细胞，以免降解mRNA。
- d. 血液：直接取新鲜血液，加入3倍体积RZ（推荐0.25 ml血液 + 0.75 ml RZ），充分振荡混匀。

2. 将匀浆样品在15-30°C放置5 min，使得核酸蛋白复合物完全分离。

3. 可选步骤：4°C 12,000 rpm (~13,400 × g) 离心5 min，取上清，转入一个新的无RNase的离心管中。

注意：如果样品中含有较多蛋白、脂肪、多糖或肌肉、植物结节部分等，可加此步骤离心去除。离心得到的沉淀中包括细胞外膜、多糖、高分子量DNA，RNA存在于上清溶液中。

4. 加入200 μl氯仿，盖好管盖，剧烈振荡15 sec，室温放置3 min。

5. 4°C 12,000 rpm (~13,400 × g) 离心10 min，样品会分成三层：黄色的有机相，中间层和无色的水相，RNA主要在水相中，水相的体积约为所用裂解液RZ试剂的50%。把水相转移到新管中，进行下一步操作。

-
6. 缓慢加入0.5倍体积无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中，4℃ 12,000 rpm (~13,400×g)离心30 sec，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱CR3，请分两次转入吸附柱CR3中，4℃ 12,000 rpm (~13,400×g)离心30 sec，弃掉收集管中的废液。
 7. 向吸附柱CR3中加入500 μl去蛋白液RD（使用前请先检查是否已加入乙醇），4℃ 12,000 rpm (~13,400×g)离心30 sec，弃废液，将CR3放入收集管中。
 8. 向吸附柱CR3中加入500 μl漂洗液RW（请先检查是否已加入乙醇），室温静置2 min，4℃ 12,000 rpm (~13,400×g)离心30 sec，弃废液。
 9. 重复操作步骤8
 10. 将吸附柱放入2 ml收集管中，4℃ 12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min，去除残余液体。
注意：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱CR3在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT-PCR等实验操作。
 11. 将吸附柱CR3转入一个新的1.5 ml离心管中，加30-100 μl RNase-Free ddH₂O，室温放置2 min，4℃ 12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min。

洗脱缓冲液体积不应少于30 μl，体积小影响回收效率。且RNA应保存在-70℃，以防降解。

注意：如果想提高RNA得率，可重复上步操作一次，合并两次得到的溶液。
